



TITLE:

# 幼若去勢ラット精囊におけるエストロジェン効果発現時のエストロジェンレセプターの変動

AUTHOR(S):

湯浅, 久子; 小野, 芳啓; 大間, 千賀子; 清水, 信明; 山中, 英寿; 内田, 勉; 水沼, 英樹; 青木, 一成; 鈴木, 慶二

---

CITATION:

湯浅, 久子 ...[et al]. 幼若去勢ラット精囊におけるエストロジェン効果発現時のエストロジェンレセプターの変動. 泌尿器科紀要 1996, 42(1): 33-37

ISSUE DATE:

1996-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/115655>

RIGHT:

## 幼若去勢ラット精囊におけるエストロゲン効果 発現時のエストロゲンレセプターの変動

群馬大学医学部泌尿器科学教室 (主任 : 山中英寿教授)

湯浅 久子, 小野 芳啓, 大間千賀子

清水 信明, 山中 英寿

群馬大学医学部生化学教室

内 田 勉

群馬大学医学部産科婦人科学教室

水沼 英樹, 青木 一成

群馬大学医療技術短期大学部

鈴 木 慶 二

## THE ESTROGEN-INDUCED CHANGES OF ESTROGEN RECEPTOR IN SEMINAL VESICLE OF IMMATURE CASTRATED RAT

Hisako YUASA, Yoshihiro ONO, Chikako OHMA

Nobuaki SHIMIZU and Hidetoshi YAMANAKA

*From the Department of Urology, Gunma University School of Medicine*

Tsutomu UCHIDA

*From the Department of Biochemistry, Gunma University School of Medicine*

Hideki MIZUNUMA and Kazunari AOKI

*From the Department of Obstetrics and Gynecology, Gunma University School of Medicine*

Keiji SUZUKI

*From the Department of Pathology, Medical Care and Technology, Gunma University*

We have already reported that estrogen treatment given to immature castrated rats caused proliferative changes in both collagen and smooth muscle in the seminal vesicles of immature rats detected by light microscopy. Herein, we studied the estrogen-induced changes in estrogen receptor (ER) in the seminal vesicles of immature castrated rats by means of enzyme immunoassay, an immunohistochemical method and RT-PCR, to clarify the mechanism of estrogen induced proliferation of collagen and smooth muscle. Immature rats (3 weeks old) were castrated and left untreated for 3 weeks and then injected subcutaneously with estradiol-17 $\beta$  (E2-17 $\beta$ , 5  $\mu$ g/day) for 7 days before they were killed. The nuclear ER content per gland, mg tissue and mg protein in the seminal vesicles of castrated rats increased markedly compared with those of non-treated rats. Castration also enhanced ERmRNA expression.

The immunohistochemical analysis demonstrated the obvious tissue distribution by which the nuclear ER positive cells were densely distributed in the periglandular stroma. The nuclear ER contents per gland, mg tissue and mg protein in the seminal vesicles of estrogen-treated castrated rats were greater than those in castrated rats. Estrogen treatment further enhanced ERmRNA expression in the castrated rats. The immunohistochemical studies demonstrated that the nuclear ER positive cells appeared among the glandular epithelial cells, basal cells and the peripheral stromal cells, in addition to the periglandular stromal cells. These findings suggest that ER is related to the estrogen induced proliferation of collagen and smooth muscle in the seminal vesicles of immature castrated rats.

(Acta Urol. Jpn. 42 : 33-37, 1996)

**Key words :** Seminal vesicle, Estrogen receptor, Immunostaining, RT-PCR

## 結 言

雄性副性器の一つである精嚢は外分泌機能をもつ腺管 (gland) とそれを取り巻くようにして存在する間質 (stroma) から成る。間質はさらに腺管周囲間質領域 (periglandular stroma region) と周辺部間質領域 (peripheral stroma region) からなる。腺管および間質の増殖・分化は内分泌環境、特にアンドロジェンの影響を大きく受けていることは明らかである<sup>1-3)</sup>。しかし、エストロジェンが副性器の腺管および間質の増殖・分化にどのように影響をおよぼしているかについてはいまだ不明な点が多い。われわれはすでに、幼若去勢ラットにエストロジェンを投与するという単純な実験系を用い、エストロジェンの精嚢の腺管・間質への影響について組織学的変化を中心に検討を行っている。幼若去勢ラットにエストロジェンを投与すると、間質増生がおこるが、腺管周囲間質領域ではおもにコラーゲン増生が、周辺部間質領域ではおもに平滑筋増生がおこることを明らかにした<sup>4)</sup>。今回われわれは、精嚢におけるエストロジェンによるコラーゲンおよび平滑筋の増生機構をさらに追求する目的で、同様の実験系で、エストロジェンレセプターの変動についてモノクローナル抗体を用いた enzyme immunoassay 法および免疫組織学的手法を用いて検討した。さらに、RT-PCR 法によって ER mRNA 発現についても検討を加えた。

## 実験材料および方法

### 1. 材料および実験スケジュール

動物は雄性ウイスター系ラットを使用し、照明時間 7:00~19:00, 室温 22±3°C に調節した部屋で飼育した。エストロジェン、 $\beta$ -estradiol 3-benzoate (E2-17 $\beta$ ) は Sigma Chemical Co. 製を使用した。実験は生後3週齢幼若ラットを去勢し、去勢後3週 (6週齢) で剖殺しこれを去勢群とした。エストロジェンの影響をみる実験ではラットを生後3週齢で去勢し、去勢後3週からエストロジェン 5  $\mu$ g を連日皮下投与し1週後 (7週齢) に剖殺しこれをエストロジェン投与

群とした。生後6週齢のラットを無処置群とした。ラットはエーテル麻酔下で脱血剖殺し、精嚢は重量測定後ただちに液体窒素で凍結し、実験まで -80°C で保存した。また精嚢の一部は 20% ホルマリン/リン酸緩衝液で固定し組織学的検討に供した。

### 2. ER の測定

佐藤らの方法に準じて行った<sup>5)</sup>。

試料の調製: -80°C で保存してある精嚢は、液体窒素下で粉末にし、TEM-Mo buffer (10 mM Tris, 1.5 mM EDTA, 2 mM mercaptoethanol, 10 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, pH 7.4) 7 倍量を加えて polytron にてホモジナイズし、800×g で5分遠心した。その上清はさらに 105,000×g で60分遠心し、上清をサイトゾル (cytosol) とした。低速の沈査 (粗核) は TEM-Mo buffer で4回洗ってから 0.4M KCl/TEM-Mo buffer 5 倍量に溶解し、0°C で60分攪拌した。27,000×g で30分遠心し、その上清を核抽出物 (nuclear extract) とした。

測定方法: ER はエストロゲンレセプター測定用キット ER-EIA 『アボット』 (ダイナボット社) を用いて測定した。本キットはビーズ (固相) にコートした抗体およびペルオキシダーゼ標識抗体にラットモノクローナル抗体を使用している。精嚢のサイトゾルおよび核抽出物はそれぞれ 100  $\mu$ l ずつとり、duplicate で測定を行った。

### 3. 免疫組織学的検討

精嚢は採取後ただちに20%ホルマリン/リン酸緩衝液 (pH 7.4) で6時間固定し、脱水後パラフィンに包埋した。脱パラフィンした切片は、抗原性賦活のために初めに 0.01M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) を入れた容器に入れ、121°C 2 気圧の滅菌条件下で10分間オートクレーブ処理した<sup>6)</sup>。免疫組織学的検討には DAKO-LSAB2 キット (ラット組織細胞標本用, DAKO 社) を使用した。切片は0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/メタノールに15分浸漬した。一次抗体として Monoclonal Mouse, Anti-Human Estrogen Receptor (DAKO-ER, 1D5)<sup>7)</sup> を使用し、50倍希釈して室温で60分反応させた。次にビオチン標識二次抗体を室温で10分、ペルオ

Table 1. Seminal vesicle weight and Estrogen receptor in non-treated, castrated or E2-17 $\beta$  treated castrated rats

Treatment (No. of rats)	Age at autopsy	Organ* weight (mg)	Frac** tion	Estrogen Receptor		
				fmoles/gland	fmoles/mg tissue	fmoles/mg protein
No treatment (10)	6 w	81.82±19.16	C	4.60 ( 4.80, 4.40)	0.06 (0.06, 0.05)	1.83 ( 1.83, 1.83)
			N	1.16 ( 1.34, 0.97)	0.02 (0.02, 0.01)	2.36 ( 2.50, 2.21)
			C+N	5.76 ( 6.14, 5.37)	0.08 (0.08, 0.06)	
Castration (24)	6 w	8.90± 1.44	C	33.21 ( 37.19, 29.23)	3.73 (4.18, 3.28)	152.44 (161.90, 142.98)
			N	3.97 ( 4.26, 3.68)	0.45 (0.48, 0.41)	81.91 ( 83.36, 80.45)
			C+N	37.18 ( 41.45, 32.91)	4.18 (4.66, 3.69)	
Castration+E2-17 $\beta$ 5 $\mu$ g/day (14)	7 w	39.07± 5.23	C	56.63 ( 57.16, 56.09)	1.45 (1.46, 1.44)	44.59 ( 46.37, 42.81)
			N	82.03 ( 86.10, 77.95)	2.10 (2.20, 2.00)	466.07 (457.70, 474.44)
			C+N	138.66 (143.26, 134.04)	3.55 (3.66, 3.44)	

\* mean±SD, \*\* C: cytosol, N: nuclear extract, C+N: cytosol+nuclear extract.

キシダーゼ標識ストレプトアビジンを室温で10分反応させた。発色には DAB を使用し室温で5分反応させた。核染はヘマトキシリンで10秒行った。

#### 4. ERmRNA の検討

ER の mRNA の検討は RT-PCR 法に用いて行った。プライマーは ER cDNA のホルモン結合領域のうち exon 6 と exon 7 を含む塩基配列約 420 bp をは

さむ。なお、このプライマーは青木ら<sup>8)</sup>により提供された。−80°C で保存してある精囊は液体窒素下で粉末にし、40～70 mg 秤量し TRIzol Reagent (Total RNA Isolation Reagent, GIBCO 社) を使って total RNA を分離した。この total RNA 1 μg について TaKaRa RNA PCR Kit を用いて RT-PCR を行った。RT-PCR 産物はその一定量を取り 2% Agarose gel で

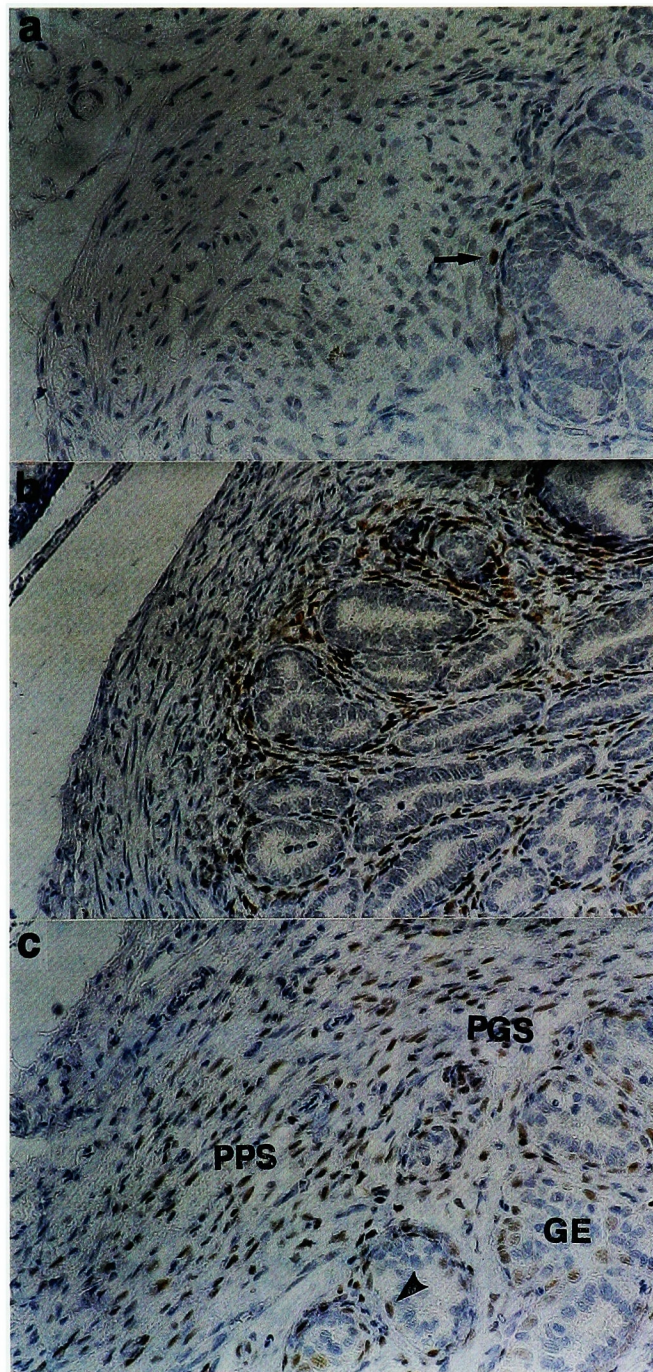


Fig. 1. Localization of ER in seminal vesicles by immunohistochemical methods. Nuclear ER staining was observed. Without treatment, few ER positive cells (arrow) were found in PGS (a). In castrated rats, numerous ER positive cells appeared densely in PGS (b). In E<sub>2</sub>-treated castrated rats, ER positive cells were found extensively in PGS, PPS, GE and basal cells (arrowhead) (c). PGS, periglandular stroma; PPS, peripheral stroma; GE, glandular epithelium. ×400

電気泳動して mRNA の確認を行った。

## 結 果

### 1. 精囊 ER への去勢の影響

幼若ラットを生後3週齢で去勢し、去勢後3週で剖殺した去勢群について、精囊 ER を EIA 法で測定し無処置群と比較した (Table 1)。さらに免疫組織学的手法を用いて ER の組織内局在について比較検討した。去勢群の精囊の重量は、無処置群のそれと比較して10.9%であり、十分な萎縮がみられた。まず去勢による ER の変動を明らかにするために、去勢群の ER 含量を無処置群の ER 含量と比較し、臓器当たり、単位重量当たりおよび単位蛋白当たりで検討した。臓器当たりでみると、去勢群の cytosol ER は無処置群約7倍、nuclear ER は3倍、total ER では6倍の増加がみられた。単位重量当たりでみると、去勢群の cytosol ER は無処置群の約62倍、nuclear ER では約23倍の増加がみられた。又単位蛋白当たりでみると、去勢群の cytosol ER は無処置群の約83倍の増加、nuclear ER では約35倍の増加がみられた。さらに、免疫組織化学的手法により ER 陽性細胞の組織内局在について検討を行った (Fig. 1)。無処置群の精囊の ER は、腺管周囲間質領域に nuclei が淡染する ER 陽性細胞がごく粗に散在性に認められた。一方、去勢群の精囊では腺管周囲間質領域に広汎にわたって nuclei が強染した ER 陽性細胞がかなり密に分布している。

### 2. 精囊 ER へのエストロジェンの影響

幼若去勢ラットにエストロジェンを投与し1週後に剖殺したエストロジェン投与群の精囊 ER を EIA 法で測定し、去勢群のそれと比較した (Table 1)。さらに、免疫組織化学的手法を用いて ER 陽性細胞の組織内分布へのエストロジェン投与による影響について検討した (Fig. 1)。まずエストロジェン投与による臓器重量変化についてみると、精囊重量は投与1週後には去勢群の4.4倍の増加が見られた。つぎにエストロジェン投与群の精囊 ER 含量の変動について検討した。臓器当たりの ER についてみると、cytosol ER は、去勢群の1.7倍という軽度の増加であったが、nuclear ER は20.7倍という大きな増加を示した。単位重量当たりでみると cytosol ER はエストロジェン投与により減少するが (去勢群の約40%) nuclear ER は4.7倍の増加を示した。また、単位蛋白当たりでも cytosol ER はエストロジェン投与により減少するが (去勢群の30%)、nuclear ER は5.7倍と逆に増加を示した。つぎに精囊 ER の組織内分布について検討した。エストロジェン投与後の精囊では腺管周囲間質領域に ER 陽性細胞がみられるのは去勢群と同様であったが、投与後のみ見られた特徴的な所見として、かなりの頻度で腺管上皮細胞および基底細胞の

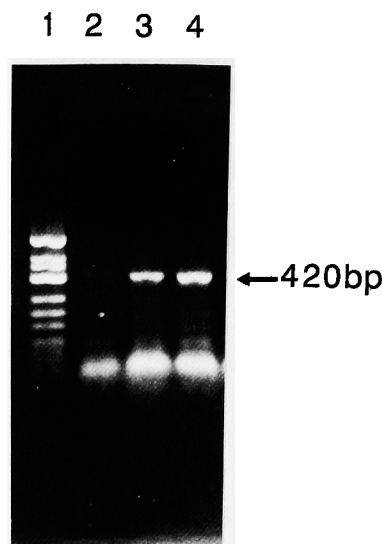


Fig. 2. Pattern of RT-PCR products separated in 2% agarose gel electrophoresis in seminal vesicles. Each lane is as follows: 1, DNA marker; 2, no treatment; 3, castration; 4, castration + E<sub>2</sub>.

nuclei が ER 陽性の所見を示した。さらに周辺部間質領域にも ER 陽性細胞が広汎にわたり出現しているのを認めた。

### 3. 精囊 ER の mRNA 発現

幼若ラット精囊の無処置群、去勢群、エストロジェン投与群について RT-PCR 法を用いて ER の mRNA 発現の比較検討した (Fig. 2)。精囊 ER の mRNA の発現は RT-PCR 産物を 2% Agarose gel で電気泳動した結果、無処置群に比較し去勢群、エストロジェン投与群ともにバンド 420 bp に ER の mRNA 発現を確認できた。

## 考 察

雄性副性器の生理的、または病理的状态におけるエストロジェンの役割についてはいまだ十分に明らかになっていない。われわれはすでに幼若去勢ラットにエストロジェンを投与するという単純な系を用いて、エストロジェンによる間質増生について組織学的変化を中心に検討し、間質内の領域の違いによって増生成分が異なること、すなわち、腺管周囲間質領域ではおもにコラーゲン増生が、周辺部間質領域ではおもに平滑筋増生がおこることを明らかにした<sup>4)</sup>。今回、同様の系を用いて、去勢およびエストロジェンによる間質増生時の ER の変動について enzyme immunoassay 法および免疫組織学的手法により検討を加えた。Table 1 から明らかなように nuclear ER 含量の臓器当たりおよび単位重量当たり、さらに単位蛋白当たりの検討において、無処置群に比較して去勢群の nuclear ER は著明な増加を示した。この去勢による ER の増加が臓器当たり約6倍であったことは、ER 新合



成がおきたことを示唆した。さらに RT-PCR 法を用いての ERmRNA 発現の検討でもその増強が見られた。今回の検討で去勢群の腺管周囲間質領域に ER 陽性細胞が密に分布し明確な組織内局在が存在することも明らかになった。ラット精囊のコラーゲン増生領域である腺管周囲間質領域に ER 陽性細胞が密に分布していたということはこの細胞がコラーゲン産生に何らかのかかわりを持っていることを推測させた。去勢ラットにエストロジェンを投与すると1週後には nuclear ER 含量が臓器当たり、単位重量当たりおよび単位蛋白当たりでも、去勢群に比較してさらに増加するということが明らかになった。このことはエストロジェン投与によって ER 新合成がさらにおきたことを示唆した。この結果は、エストロジェン投与によって ER 陽性の腺管上皮細胞がさらに出現してくるという免疫組織学的所見に相関するものであった。また RT-PCR 法でえられた結果からはエストロジェン投与群の ERmRNA の発現が去勢群と同様に無処置群に比較して増強したことが明らかになった。今回の実験で精囊間質に見られた ER 陽性細胞はいわゆる“fibroblastic cells”に相当する細胞ではないかと推測される。一般に臓器間質に現れる fibroblastic cells は多くの潜在能力を持ち、平滑筋変換能力をも持っていることが指摘されている<sup>9)</sup>。このような仮説を証明するためには in vitro 実験をまじえた詳細な実験系によりさらなる検討を進めなければならない。

## 結 語

今回、われわれは、精囊におけるエストロジェンによるコラーゲンおよび平滑筋の増生機構をさらに追求する目的で、エストロジェンレセプターの変動についてモノクローナル抗体を用いた enzyme immunoassay 法および免疫組織学的手法によって検討した。さらに、RT-PCR 法によって ERmRNA 発現についても検討を加え、以下の結論をえた。

1. 去勢した幼若ラット精囊の nuclear ER は臓器当たり、単位重量当たり、および単位蛋白当たりの検討において、無処置群に比較して含量が著明に増加した。さらに腺管周囲間質領域に ER 陽性細胞が密に分布し、ER の明確な組織内局在を認めた。また RT-PCR 法を用いての ERmRNA 発現の検討でもその増強を認めた。

2. 去勢ラットにエストロジェン投与し1週後には精囊の nuclear ER は臓器当たり、単位重量当たりおよび単位蛋白当たりでも、去勢群に比較して含量がさらに増加した。このことは、エストロジェン投与に

よって腺管上皮細胞、基底細胞および周辺部間質領域に ER 陽性細胞がさらに出現してくるという免疫組織学的所見に相関した。また RT-PCR 法の検討では、無処置群に比較して去勢群同様に ERmRNA 発現の増強を認めた。

本研究の経費の一部は文部省科学研究費 (No. 05454431) の援助を受けた。

## 文 献

- 1) Mariotti A, Thornton M and Mauwhinney M: Action of androgen and estrogen on collagen levels in male accessory sex organs. *Endocrinology* **109**: 837-843, 1981
- 2) Thornton MO, Frederickson R, Mata L, et al.: Preliminary studies on the relationship between collagen and the growth of male accessory sex organ epithelial cells. In: *New Approaches to the Study of Benign Prostatic Hyperplasia*. Edited by Kimball FA, Buhl AE and Carter DB, pp. 143-158, Alan R. Liss Inc., New York, 1984
- 3) 湯浅久子, 深堀能立, 真下 透, ほか: ラット雄性副性器の腺管上皮および間質のホルモン反応特性. *泌尿紀要* **39**: 631-637, 1993
- 4) Ono Y, Yuasa H, Ohma C, et al.: Eosinophils infiltration in the rat seminal vesicle associated with estradiol-17 $\beta$  related stromal proliferation. *Tohoku J Exp Med* **175**: 163-169, 1995
- 5) Nakao M, Sato B, Koga M, et al.: Identification of immunoassayable estrogen receptor lacking hormone binding ability in tamoxifen-treated rat uterus. *Biochem Biophys Res Commun* **132**: 336-342, 1985
- 6) Shin RW, Iwaki T, Kitamoto T, et al.: Methods in laboratory investigation. Hydrated autoclave pretreatment enhances TAU immunoreactivity in formalin-fixed normal and Alzheimer's disease brain tissues. *Lab Invest* **64**: 693-702, 1991
- 7) Al Satti T, Clamens S, Cohen-Knafo E, et al.: Production of monoclonal antibodies to human estrogen-receptor protein (ER) using recombinant ER (RER). *Int J Cancer* **55**: 651-654, 1993
- 8) 青木一成, 水沼英樹, 内田 勉, ほか: 内部標準を用いた定量的 PCR によるエストロゲン受容体 mRNA の微量測定法の検討. *日産婦会誌* **47** (Suppl): 380, 1995
- 9) Sappino AP, Schurch W and Gabbiani G: Biology of disease. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: Expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest* **63**: 144-161, 1990

(Received on April 5, 1995)

(Accepted on October 3, 1995)